

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЙ И ЭТИЛЕНИМИНА НА ХЛОРЕЛЛУ

В. И. Хропова, К. В. Квитко, Н. А. Захаров

Искусственное получение наследственных изменений у организмов, вводимых в культуру, является основным путем к быстрому изменению их природы. Это было блестяще продемонстрировано при селекции микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, витаминов и других важных органических соединений, трудно синтезируемых химическим путем.

В настоящее время имеется богатый опыт по окультуриванию хлореллы, одноклеточной зеленой водоросли с высоким коэффициентом использования солнечной энергии. Проблема селекции у этой водоросли — одна из наиболее актуальных. Изучение многообразия наследственной изменчивости и методов вызывания ее — многообещающий путь для решения проблем селекции у хлореллы.

Полвека назад было установлено, что встречающиеся в природе формы хлореллы можно разделить на два типа: стабильные — фототрофные, темно-зеленые и зеленые, нестабильные — пестрые формы, дающие бесцветные варианты. Нестабильные формы хлореллы, обычно находимые в гетеротрофных условиях, были отнесены к виду *Chlorella variegata*. Бейеринк (Beijerinck, 1904), Пекло (Peklo, 1914) и Мейер (Meyer, 1932) описали разнообразные переходы окраски у форм *Chlorella variegata* — от темно-зеленых к желтым и бесцветным. Еще более широкую картину изменчивости наблюдал Шода (Chodat, 1913, 1929), у зоохлорелл и в потомстве особо мутабельной формы *Chlorella rubescens*. Им отмечены различия по скорости роста, размеру клеток, по морфологии колоний (округлые, лопастные, морщинистые, секториальные) и по окраске (темно-зеленые, светло-зеленые, желто-зеленые, канареечные, бесцветные, буроватые, красные). Автор связывает возникновение всех этих форм с непрерывно идущим спонтанным мутационным процессом.

Об изменчивости среди фототрофных хлорелл ничего не было известно вплоть до опытов по индуцированию мутаций. Впервые индуцированные мутации у хлореллы получены в 1948 г. с помощью ультрафиолетовых (Davis, 1948) и рентгеновых лучей (Granick, 1948). Авторами выделены нефотосинтезирующие с нормальной пигментацией и пигментные мутанты (белые, желтые и желто-зеленые), напоминающие варианты, возникающие спонтанно у мутабельных форм, выделенных из природы. Дальнейшие работы прибавили много новых фактов о разнообразии мутантов и о биохимическом составе их (Schwarze и Frandsen, 1960; Bendix и Allen, 1962; Варасова, Квитко, 1962) и показали важность пигментных мутаций для расширения путей биосинтеза пигмен-

тов (Claes, 1954; Granick, 1951), а также для выяснения роли отдельных пигментов в фотосинтезе (Аллен, 1962). Однако цели этих экспериментов были больше физиологическими, чем генетическими. Давая представление о многообразии мутантов, эти исследования не указывали наиболее эффективные пути к получению их. Не было ясно, какие мутагены и в каких дозах будут более эффективны в индуцировании наследственных изменений.

При кафедре генетики и селекции ЛГУ, начиная с 1959 г., было проведено изучение мутагенной эффективности рентгеновых и ультрафиолетовых лучей, а также химического соединения этиленimina при действии на хлореллу. Возможность постановки таких экспериментов возникла, когда было показано, что в опытах с хлореллой успешны обычные микробиологические методы получения клоновых культур (Квитко, 1961 а), и разработаны основы метода учета изменчивости по характеру колоний (Квитко, 1961 б).

Выбранные мутагены представляют собой три основных типа мутагенных воздействий. Ионизирующие излучения, в том числе рентгеновы лучи, обладают высокой энергией одного кванта, в тысячи раз большей, чем энергия разрыва простых химических связей. Эффект рентгеновых лучей обычно проявляется в виде перестроек хромосом; поглощение энергии этого излучения не избирательно. Ультрафиолетовое излучение характеризуется низкой энергией кванта, достаточной для разрыва лишь одиночных валентных и водородных связей в молекулах. Существует корреляция между химической структурой вещества и его способностью поглощать УФ-лучи. Белки поглощают УФ-лучи с длиной волны 230—250 и 270—290 мик. Для ДНК характерно поглощение в области 250—270 мик. Для самых разнообразных организмов показано совпадение мутагенного спектра УФ-лучей со спектром поглощения ДНК. Большинство индуцированных УФ-лучами мутаций оказываются не связанным с крупными хромосомными изменениями. Для хлореллы выяснено, что наиболее эффективны по своему детальному действию УФ-лучи с длиной волны около 260 мик (Meier, 1936), что, вероятно, связано с поражением ДНК ядра клеток. Мутагенный и детальный эффект УФ-лучей могут быть изменены действием дополнительных факторов (температуры, состава среды, видимого света). Наиболее изучено явление фотореактивации (Барабой, 1961). Фотореактивация мутагенного эффекта УФ-лучей на хлореллу ранее не изучалась.

Этиленимин $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \end{array}$ — вещество, мутагенные свойства ко-

рого открыты в 1947 г. И. А. Рапопортом (1948). Это — один из сильнейших химических мутагенов. Этиленимин относится к числу алкилирующих соединений, способных активировать другие молекулы. В химическом отношении его действие не специфично. При изучении различных организмов установлено, что этиленимин вызывает как хромосомные, так и точковые мутации.

Материалом для нашего исследования послужил штамм В *Chlorella vulgaris*, выделенный из культуры № 7 коллекции Биологического института ЛГУ. Это стабильный штамм, способный как к фототрофному, так и хемотрофному типу питания. Колонии этого штамма темно-зеленого цвета, гладкие, округлые. Частоты встречаемости спонтанных мутантов с качественным отличием (морщинистых, желтых, салатных и белых) ниже, чем $0,6 \cdot 10^{-3}\%$.

Исходную форму поддерживали в коллекции на косом агаре полной питательной среды (ФДАГА), состоящей из минерального раствора

Ф, 1%-ного дрожжевого автолизата, 2%-ной глюкозы и 2%-ного агара (Квитко, Хропова, 1963). Эта среда была в равной степени пригодна как для исходного штамма, так и для гетеротрофных мутантов, возникших в результате действия мутагенов. Регулярные проверки генетической чистоты штамма В в обычных условиях показали его высокую стабильность.

Облучению рентгеном подвергались клетки, смытые с двудневных посевов на среде ФДАГА. Большинство клеток в такой суспензии должно было находиться в фазе деления. Суспензии клеток в дистилляте помещали в стеклянные бюксы при толщине слоя 1,5 мм и облучали. Режим облучения: аппарат РУМ-7, напряжение 40 кВ, фильтр 0,1 мм Al, мощность дозы 8000 р/мин.

До облучения УФ-лучами физиологическое состояние клеток было выравнено путем следующей процедуры синхронизации. Штамм В после 4—7 суток выращивания в минеральном растворе Ф при 4—5 тыс. лк света от люминисцентных ламп подвергался двукратному центрифугированию при 1000 об/мин: надосадочную жидкость после 6 мин первого центрифугирования вновь осаждали в течение 12 мин. Этот осадок суспензировали в дистилляте и только после этого брали для облучения. Дистиллят был удобен в этом случае, поскольку поглощение УФ-лучей в нем минимальное. На жизнеспособности клеток контрольного варианта пребывание в дистиллированной воде не сказывалось.

Облучение проводили в чашке Петри стандартного размера с 15 мл суспензии густотой 5 млн. клеток в 1 мл. Источник УФ-лучей — лампы БУВ-30, смонтированные на специальной установке, позволяющей регулировать равномерность и интенсивность освещения. Интенсивность УФ-потока определялась по уфиметру УФМ-11 и составляла 50 эрг/мм²·сек для волн в диапазоне от 240 до 280 мкм. Согласно техническому описанию более 80% всей энергии излучения лампы БУВ-30 падает на длину 254 мкм, что очень близко к максимуму поглощения ДНК. Экспозиции были взяты в пределах от 10 до 300 сек, что составляет дозы от 500 до 15 000 эрг/мм².

Подготовка для обработки этиленимином была той же, как и для обработки УФ-лучами: клетки подращивались в минеральном растворе и два раза центрифугировались для отмывки и фракционирования. Отличие состояло лишь в том, что фракционированные клетки (осадок от второго центрифугирования) суспензировались в растворе Ф (что должно было воссоздать нормальные осмотические условия). Этиленимин разводили в растворе Ф до следующих концентраций по объему: 1/800, 1/1000, 1/2000, 1/4000. После 60 мин воздействия суспензии разбавляли, чтобы снизить эффективную концентрацию этиленимина в 100 и более раз.

Суспензии клеток в соответствующих разведениях после обработки мутагенами рассеивали по 0,05—0,1 мл на полную среду и втирали шпателем. Инкубацию проводили в течение 7—10 дней при 30°С в темноте. Выживаемость определяли в процентах числа колоний в опыте к числу колоний, выросших в контрольном варианте. Вариант с фотореактивацией выставляли перед инкубацией на свет интенсивностью в 4—5 тыс. лк в течение 70 мин. Число и характер цветных мутаций определяли при просмотре невооруженным глазом и под препаровочным микроскопом МБС-1.

Сравнение мутагенной эффективности разных факторов возможно, если уравнены их дозы по физическим или биологическим показателям. Одним из наиболее доступных путей является сопоставление доз, дающих одинаковую смертность клеток.

С этой целью было прежде всего изучено «отмирание» клеток при действии разных доз изучаемых мутагенов. Для каждой дозы проведено от 4 до 10 повторных опытов (рис. 1). Кривые зависимости выживания от дозы рентгеновых лучей и от концентрации этиленimina показывают пороговый характер летального эффекта обоих мутагенов. При облучении УФ-лучами так же, как и при его действии с последующей фотореактивацией, пороговая доза, если она существует, очень невелика. Фотореактивация в описанных условиях приводит к значительному снижению гибели клеток. Следует отметить неоднородность клеточной популяции в отношении чувствительности к УФ-лучам. Фракция клеток, выживающая при дозах свыше 2500 эрг/см² менее чувствительна, что следует из изменения наклона кривой выживания (рис. 1, б). Для рентгеновых лучей подобной неоднородности на чувствительности анализом характера кривой не обнаружено.

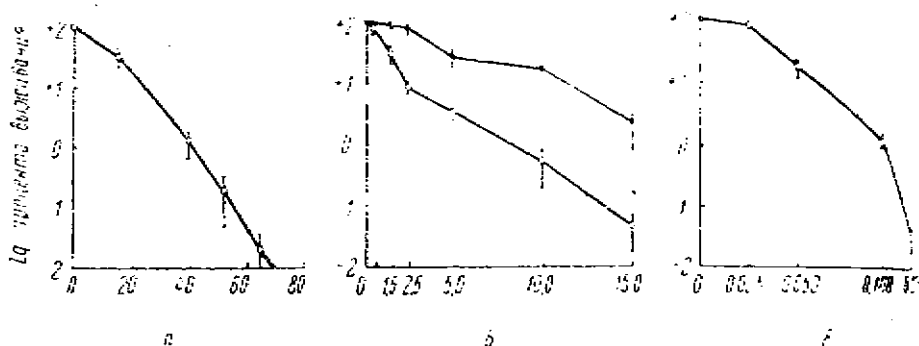


Рис. 1. Выживание клеток хлореллы при действии разных доз мутагенов (средние значения и границы возможных отклонений при 95%-ном доверительном уровне): а — рентгеновые лучи (дозы в тыс. рентген); б — ультрафиолетовые лучи (дозы в эрг/см²); в — ультрафиолетовые лучи с последующей фотореактивацией (Дозы в эрг/см²; концентрация фл. 10⁶ клеток).

Во всех опытах одновременно с учетом выживания регистрировалась частота пигментных мутаций. На рис. 2 представлены результаты изучения частоты мутаций, индуцированных рентгеновыми лучами. На экспериментальных точках было найдено уравнение регрессии процент мутаций от выживаемости клеток. Это уравнение имеет вид:

$$y = 0,728 - 0,193 x,$$

где x — логарифм процента выживания, y — процент мутаций.

На графике экспериментальные точки в диапазоне доз, дающих выживание от 31,3 до 0,017% (логарифмы процента выживания соответственно равны 1,4913 и —1,7696), почти идеально ложатся на линию регрессии. Таким образом, зависимость частоты мутаций от выживаемости при облучении рентгеновыми лучами оказывается линейной.

На рис. 3 найденная линия регрессии сопоставлена с данными опытов по использованию этиленimina и УФ-лучей. Результаты опытов по облучению УФ с последующей фотореактивацией полностью совпадают с кривой, построенной для УФ-лучей, и на данном рисунке не приведены.

При рассмотрении кривых рис. 3 прежде всего обращает на себя внимание совпадение точек, характеризующих мутагенный эффект этиленimina с линией регрессии для рентгеновых лучей. Очевидно, факторы сходны по своему действию на клетку, а линейность зависимости частоты мутаций от выживания показывает, что летальный и мутагенный эффекты в этом случае имеют общие механизмы. Возможно, эти

связано с тем, что гибель клетки вызвана возникновением летальных мутаций.

Отсутствие линейной зависимости между частотой мутаций и выживанием при действии УФ-лучей говорит о том, что летальный и мутагенный эффекты этого фактора имеют в клетке разные пути реализации. S-образный характер кривой подчеркивает, что для индуцирования и реализации мутации пороговая доза УФ-лучей выше, чем для летального эффекта. Подобные факты могут быть истолкованы как доказательство многоударной природы мутаций, индуцированных УФ-лучами (Doudney a. Young, 1962). Интересно, что при изучении мутационного процесса у кишечной палочки обнаружен мутагенный эффект таких доз УФ-лучей, которые не оказывают летального действия. Однако и в этом случае обнаружено наличие пороговой дозы (Shankel a. Wyss, 1960).

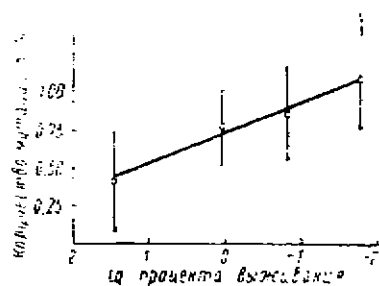


Рис. 2. Связь между возникновением мутаций и выживаемостью особей при действии рентгеновых лучей (средние значения и границы возможных отклонений при 95%-ном доверительном уровне).

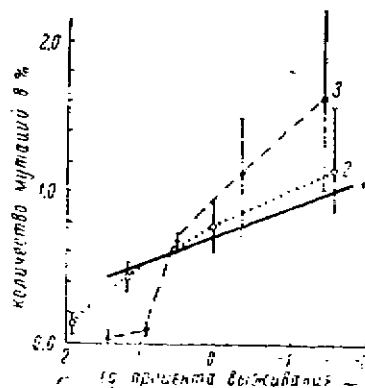


Рис. 3. Связь между возникновением мутаций и выживаемостью при действии ультрафиолетовых лучей и этиленмина в сопоставлении с действием рентгеновых лучей (средние значения и границы возможных отклонений при 95%-ном доверительном уровне).

1 — линия регрессии процента мутаций от соотношения процента выживаемости при действии рентгеновых лучей;
2 — результаты действия этиленмина;
3 — результаты облучения УФ.

Несовпадение рассматриваемых кривых для УФ-лучей, с одной стороны, и рентгеновых лучей и этиленмина, с другой, свидетельствует о том, что летальное и мутагенное действие этих факторов достигается различными механизмами.

Наконец, надо отметить совпадение данных, характеризующих действие УФ-лучей и УФ-лучей с последующей фотореактивацией. Отсюда можно заключить, что фотореактивация в одинаковой мере снимает как мутагенный, так и летальный эффекты облучения.

Проведенное сравнение позволяет оценить эффективность изученных мутагенов. При высоких дозах (большой смертности) наиболее эффективными являются УФ-лучи. При слабых биологических дозах (по летальному эффекту) рентгеновы лучи и этиленмин достоверно более эффективны в индуцировании пигментных мутаций; это можно истолковать как свидетельство того, что достаточно одного удара (или акта взаимодействия) для вызывания эффекта мутации.

Картина сходства в характере генетического эффекта при воздействии рентгеновыми лучами и химическими мутагенами отмечена Дарлингтоном и Коллером (Darlington a. Koller, 1947). Ауэрбах и Робсоном (Auerbach, 1949). Однако другими исследователями подобный параллелизм не был обнаружен. Так, например, сравнивая эффективность трех различных мутагенов — рентгеновых лучей, УФ-лучей и этиленмина — на фагоустойчивость и получение обратных прототрофных мутаций у некоторых штаммов *Act. obidaceus* (продуцентов витамина В₁₂), С. И. Алиханян и Н. И. Жданова (1960) показали значительно большую эффективность этиленмина. Такие диаметрально противоположные результаты, по-видимому, можно связывать с особенностями изучавшихся объектов, так и признаков.

На основании результатов выполненных нами опытов имеется возможность определить, существует ли относительная специфичность разных мутагенов по характеру индуцируемых мутаций. При действии всех изученных мутагенов наблюдается сходный спектр мутаций. Были обнаружены мутанты: ауксотрофные (Захаров, Фролунская, 1962; Квятко, Хромова, 1963), с маришистой колонией, с белыми бурей пигмент в среду, медленно растущие и разнообразно измененные. В исследуемых здесь опытах количественно учитывались только два четко различившихся класса мутантов — желтые и салатные (свободная белая).

Количество желтых и салатных мутантов, индуцируемых разными дозами одного и того же фактора, сравнивалось методом χ^2 . Для всех мутагенов достоверных различий между разными дозами фактора не было ($p > 0.05$). Это позволяет суммировать материал по каждому из мутагенов (см. таблицу). Статистическая обработка в этом случае показала полную равнозначность при сравнении любой пары факторов.

Таблица

Соотношение желтых и салатных мутантов при действии различных мутагенов

Мутаген	Число мутантов		Доля салатных и белых в % к числу желтых	χ^2	p
	желтых	салатных и белых			
Этиленмин	174	51	29	7.11	0.01
Рентгеновы лучи	150	76	51	11.72	0.01
УФ-лучи	157	148	94		0.05
УФ-лучи, фотореактивация	71	103	145		0.02

Как видно по данным таблицы, соотношение желтых и салатных мутантов для разных мутагенов изменяется. Измененная окраска колоний у мутантов может быть связана с разными нарушениями в клетке. У желтых мутантов нарушен только биосинтез хлорофилла. Салатные и белые мутанты могут быть двоякого рода: сохранившие хлоропласт, потерявшие хлоропласт. Бесцветные мутанты с хлоропластом должны иметь повреждения в биосинтезе всех пигментов, как хлорофиллов, так и каротиноидов (Butler, 1954).

Малые дозы мутагенов в первую очередь индуцируют мутации с меньшим числом изменений (желтые), при больших дозах вероятно появление сложных по природе мутаций (салатные и белые). Для воздействия УФ-лучами характерно, что слабые дозы индуцируют относи-

тельно малое число мутаций, и их основная масса является результатом действия больших доз, вызывающих более чем один эффект. Возможно, что именно поэтому доля салатных мутантов в случае воздействия УФ-лучами значительно выше. Помимо того, часть белых мутантов потеряла хлоропласт как структуру клетки. Это должно сказаться в меньшей фотореактивируемости белых мутаций, что и имело место в наших опытах. Пропорция белых среди пигментных мутаций наивысшая в случае воздействия ультрафиолетовыми лучами с последующей фотореактивацией.

Итак, результаты наших опытов показывают специфичность действия изученных факторов и открывают возможность для суждения о генетической природе пигментных мутантов хлореллы.

ВЫВОДЫ

1. Зависимость частоты индуцированных пигментных мутаций у хлореллы от выживаемости клеток оказывается линейной при облучении разными дозами рентгеновых лучей.

2. При воздействии этиленimina зависимость частоты мутаций от выживаемости совпадает с таковой для рентгеновых лучей. Для УФ-лучей кривая зависимости оказывается S-образной.

3. При дозах, дающих высокую смертность клеток, УФ-лучи оказываются наиболее эффективным мутагеном; при дозах, дающих менее 90% смертности, рентгеновы лучи и этиленимин более эффективны в индуцировании пигментных мутаций.

4. В действии мутагенов наблюдается относительная специфичность. Для сравниваемых мутагенов отношение числа салатных мутантов к числу желтых наиболее высоко при воздействии УФ-лучами (особенно при фотореактивации) и наиболее низко при действии этиленимина.

A COMPARATIVE STUDY OF THE MUTAGENIC ACTION OF DIFFERENT TYPES OF RADIATION AND ETHYLENIMINE ON THE ALGA CHLORELLA

V. I. Khropova, K. V. Kvitko and I. A. Zakharov

This is a comparative study of the mutagenic action of X-rays, ultra-violet and ethyleneimine on the alga *Chlorella* for doses with the same lethal effect. The frequency of appearing of two types of pigment mutants (white and yellow colonies) was a criterion of the mutagenic effect.

The ultra-violet rays appear to be more effective than other mutagens for doses with high lethal activity. The X-rays and ethyleneimine were more effective for doses with lethal effect less than 90%.

The mutation spectrum was similar for all three mutagens, but relative amounts of white and yellow mutants were different for each mutagen.

ЛИТЕРАТУРА

- Алиханян С. И., Н. И. Жданова. 1960. ДАН СССР, 133, 2: 154—158.
Аппен М. В. 1962. Тр. V Межд. биохим. конгр. Симпозиум VI: 145—155.
Барабой В. Н. 1961. «Гигиена и санитария», 3: 72—81.
Варасова Н. Н., К. В. Квитко. 1962. Вестник ЛГУ, 15: 119—123.
Захаров И. А., Н. И. Фридлянская. 1963. Вестник ЛГУ, 9: 159—160.
Квитко К. В. 1961а. В сб.: Исследования по генетике, I. Изд. ЛГУ: 52—54.

- Квитко К. В. 1961б. В сб.: Межвузовская конференция по экспериментальной ботанике, ч. 1. Тез. докл. Изд. ЛГУ: 68.
- Квитко К. В., В. И. Хропова. 1963. Вестник ЛГУ, 9: 150—156.
- Рапопорт И. А. 1948. ДАН СССР, 60, 3: 469—472.
- Auerbach C. 1949. Biol. rev., 24, 3: 355—391.
- Beijerinck M. 1904. Recueil des Travaux botan. Neerl., 1: 14—27.
- Bendix S. a. M. Allen. 1962. Arch. f. Microb., 41: 115—141.
- Butler E. 1954. «Science», 120, 3111: 274—275.
- Chodat R. 1913. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, 42.
- Chodat R. 1929. Compté de phys. et d'hist. natur. de Genève, 46, 1: 31—38.
- Claes H. 1954. Zs. Naturforschung, 9b, 7: 481.
- Davis E. 1948. «Science», 108: 110—111.
- Doudney C. a. C. Young. 1952. «Genetics», 47, 9: 1125—1138.
- Darlington C. a. P. Koller. 1947. «Heredity», 1: 187—221.
- Granick S. 1948. J. biol. chem., 172, 2: 717—727.
- Granick S. 1951. Ann. rev. plant physiol., 2: 115—144.
- Meier E. 1936. Smith Misc. Coll., 95, 2: 1—19.
- Meyer H. 1932. Bot. Zbl., 49, 1: 491—549.
- Peklo I. 1914. Rozpravy Ceske Akad. ved. skvencst., 1914, Prida II, 23, 43: 1—4.
- Shankel D. a. O. Wyss. 1960. Bact. proc. soc. Amer. 46: 1, 1: 67—68.
- Schwarze P. u. N. Frandsen. 1960. «Naturwiss.», 47, 11: 2—17.